

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

EP 00/02904

15. Juni 2000

PRIORITY DOCUMENT
 SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
 COMPLIANCE WITH
 RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D	07 JUL 2000
WIPO	PCT

09/937754

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
 einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 199 14 702.7

Anmeldetag: 31. März 1999

Anmelder/Inhaber: Professor Dr. Norbert H a m p p, Amöneburg/DE

Bezeichnung: Verfahren und Zubereitung zur photochromen Markierung und/oder Sicherung der Authentizität von Gegenständen

IPC: B 44 F, C 09 B

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Anmeldung.

München, den 09. Juni 2000
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Seiler



PATENTANWÄLTE

European Patent Attorneys

European Trade Mark Attorneys

DIPL.-ING. H. WEICKMANN
DIPL.-ING. F. A. WEICKMANN
DIPL.-CHEM. B. HUBER
DR.-ING. H. LISKA
DIPL.-PHYS. DR. J. PRECHTEL
DIPL.-CHEM. DR. B. BÖHM
DIPL.-CHEM. DR. W. WEISS
DIPL.-PHYS. DR. J. TIESMEYER
DIPL.-PHYS. DR. M. HERZOG
DIPL.-PHYS. B. RUTTENSPERGER

POSTFACH 860 820
81635 MÜNCHEN

KOPERNIKUSSTRASSE 9
81679 MÜNCHEN

TELEFON (089) 4 55 63-0
TELEX 5 22 621
TELEFAX (089) 4 70 50 68
E-MAIL email@weickmann.de

Unser Zeichen:
19698P DE/TISPct

Anmelder:

Prof. Dr. Norbert Hampp
Schillerstraße 10

35287 Amöneburg-Roßdorf

Verfahren und Zubereitung zur photochromen Markierung und/oder
Sicherung der Authentizität von Gegenständen

**Verfahren und Zubereitung zur photochromen Markierung und/oder
Sicherung der Authentizität von Gegenständen**

5

Beschreibung

10

15

20

25

30

Sicherheitstechnische Anwendungen zur Sicherung der Authentizität von Dokumenten oder Gegenständen umfassen den Einsatz geeigneter Sicherungsmerkmale oder Authentisierungsmarkierungen. Der Nutzen photochromer Materialien für solche sicherheitstechnischen Anwendungen wurde bereits erkannt. Anwendungsbeispiele sind z. B. in US 4 927 180 beschrieben. Das photochrome Identifizierungsmerkmal wird bei den bekannten Beispielen durch den Einsatz von UV-Licht sichtbar gemacht. Als solches ist das verwendete Identifizierungsmerkmal aber nicht oder nur schlecht zu erkennen, so daß die Gefahr besteht, daß der Anwender das Fehlen des Identifizierungsmerkmals nicht bemerkt. Für die Augen des Authentizitäts-Prüfers ist wegen der Verwendung von UV-Licht ein geeigneter Schutz notwendig. Die Verwendung von UV-Licht zur Identifizierung des Sicherheitsmerkmals kann deswegen als unvorteilhaft angesehen werden. Ein ähnlicher Stand der Technik ist in US 5 807 625 dargelegt. Wiederum gelangt hier UV-Licht zur Sichtbarmachung des Sicherheitsmerkmals zum Einsatz.

Organische photochrome Materialien, die in den genannten Dokumenten offenbart sind, weisen eine typische Schaltzyklenzahl von 10^4 - 10^5 auf. Hierdurch ist die Zahl der möglichen Prüfvorgänge zur Identifizierung des Sicherheitsmerkmals begrenzt. Ein Einsatz für automatisierte Testverfahren, wie z.B. in Geldautomaten oder Zugangskontrolleinrichtungen, ist deshalb für die genannten Sicherheitsmerkmale nicht oder nur bedingt möglich.

Wünschenswert ist weiterhin, eine bestimmte Charge einer Markierungszubereitung identifizieren zu können und z.B. so bei Verlust oder

unrechtmäßiger Entwendung der für Sicherungszwecke hergestellten Zubereitungen den jeweiligen Ursprung feststellen zu können. Die in den genannten Dokumenten zum Stand der Technik offenbarten Sicherheitsmerkmale sind für derartige Anwendungen nicht verwendbar.

5

Konventionelle photochrome Materialien haben außerdem den Nachteil, daß einer ihrer beiden Schaltzustände keine merkliche Eigenfärbung aufweist.

Ein Ziel der Erfindung ist es, ein optisch detektierbares Sicherungsmerkmal bereitzustellen, bei dem sowohl der Bleich- als auch der Löschkvorgang mit Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich durchgeführt werden kann. Solcherart ließe sich ein Farbwechsel mit preiswerten und überall verfügbaren Lichtquellen, z.B. Leuchtdioden, induzieren. Selbst mit einfachem Lampenlicht wäre ein Test dann möglich und mit bloßem Auge detektierbar. Weiterhin wäre es erstrebenswert, ein Sicherungsmerkmal bereitzustellen, das eine Anzahl von Schaltzyklen aufweist, die über 10^4 - 10^5 liegt.

Ziel ist es weiterhin, eine Vielzahl von einander strukturell ähnlichen, photochromen Materialien bereitzustellen, die sich in ihrer Färbung und/oder ihrem Farbwechsel unterscheiden.

Während die im Stand der Technik bekannten Sicherheitsmerkmale aufgrund des geringen technischen Aufwandes für ihre Überprüfung als Niedrigsicherheitsmerkmale definiert werden können, besteht ein weiteres Ziel darin, zusätzlich Hochsicherheitsmerkmale bereitzustellen, deren Überprüfung technisch anspruchsvoll ist und damit dem Laien nicht möglich ist.

Niedrigsicherheitsmerkmale sind Merkmale, deren Analyse geringe Finanzmittel (Pfennigbereich) verbraucht und die von jedermann durchgeführt werden kann, während Hochsicherheitsmerkmale solche

Merkmale sind, deren Analyse mehrere hunderttausend DM umfassen kann und die in Labors von Spezialisten durchgeführt werden. Niedrigsicherheitsmerkmale bieten Schutz gegen "Jedermann"-Fälschungstechniken, da Photochromie nicht mit bekannten Techniken 5 reproduzierbar ist.

Hochsicherheitsmerkmale umfassen die Individualisierung der einzelnen Sicherheitsfarben für Anwendungen oder Anwender bis hinab auf den Level der Chargencodierung.

10 Der Einsatz von Nukleinsäure-Molekülen, insbesondere DNA-Molekülen, die durch geeignete Amplifikationsreaktionen, wie z.B. der PCR-Reaktion mittels spezifischer Primer, detektiert werden können, als unsichtbares Hochsicherheitsmerkmal wird in WO 9806084 offenbart.

15 Gemäß der vorliegenden Erfindung ist es gelungen, ein Material, nämlich Bakteriorhodopsin zu finden, in dem ein Niedrigsicherheitsmerkmal, wie z.B. die Photochromie, mit einem Hochsicherheitsmerkmal, das z. B. die Identifizierung von Einzelchargen erlaubt, kombinierbar ist und dieses 20 Material zur Markierung bzw. Authentisierung von Gegenständen zu nutzen.

Ein erfindungsgemäßes Verfahren zur Sicherung der Authentizität von Gegenständen unter Verwendung einer Bakteriorhodopsin enthaltenden Tinte ist in Anspruch 1 angegeben, wobei Weiterbildungen hierzu in den 25 Ansprüchen 2 - 15 dargelegt sind.

Aus Mikroorganismen der Gattung Halobacterium kann das Protein Bakteriorhodopsin in großen Mengen gewonnen werden. Das Wildtyp-Bakteriorhodopsin ist dem Fachmann in seinen grundlegenden photochemischen und physikalischen Eigenschaften gut bekannt als photochromes Material, welches, durch Licht aktiviert, eine zyklische Folge 30 von Intermediaten durchläuft. Zur Modellierung der photochromen

Eigenschaften wird hierbei ein stark vereinfachter Photozyklus benutzt, der nur noch zwei Zustände enthält, die als B- und M-Zustand bezeichnet werden. Durch Einstrahlung von Licht der Wellenlänge 568 nm wird der purpurfarbene B-Zustand in den gelbfarbenen M-Zustand umgewandelt, der seinerseits durch Absorption von Licht der Wellenlänge 412 nm in den B-Zustand zurückverwandelt wird. Bakteriorhodopsin-Material kann also mit gelb-grünem Licht gebleicht werden, wobei die Purpurfärbung verschwindet und die gelbe Färbung erscheint. Man kann dann abwarten, bis die Purpurfärbung sich durch thermische Relaxation wieder einstellt, oder man benutzt blaues Licht, um das Bakteriorhodopsin-Material photochemisch wiederum in den B-Zustand zurückzuversetzen. Eine Übersicht der genannten Eigenschaften des Bakteriorhodopsins findet sich in N. N. Vsevolodov, Biomolecular Electronics: An Introduction via Photosensitive Proteins, Birkhäuser, Boston, 1998 und in D. Oesterhelt, C. Bräuchle, N. Hampp, Bacteriorhodopsin: A Biological Material for Information Processing. Quarterly Review of Biophysics, 24 (1991) 425 - 478.

Dem Fachmann ist bekannt, daß es eine ganze Reihe von Varianten des Bakteriorhodopsins gibt, die zwar die gleiche Anfangsfärbung aufweisen wie der Wildtyp, sich jedoch in der Kinetik ihres Photozyklusses teilweise erheblich unterscheiden. Ein bevorzugtes Beispiel ist die Variante BR-D96N. Deren Eigenschaften sind in verschiedenen Publikationen beschrieben, z.B. in A. Miller, D. Oesterhelt, Kinetic Optimization of Bacteriorhodopsin by Aspartic Acid 96 as an Internal Proton Donor, Biochim. Biophys. Acta 1020 (1990) 57 - 64.

Das Bakteriorhodopsin kann vorteilhafterweise mit sichtbarem Licht gebleicht werden. Als vorteilhaft hat sich ein Wellenlängenbereich von 500 bis 600 nm erwiesen. Die Rückführung des Bakteriorhodopsins in den Ausgangszustand kann dann durch thermische Relaxation oder durch Einstrahlung von Licht eines zweiten Wellenlängenbereichs erzielt werden.

Für diesen zweiten Wellenlängenbereich werden vorteilhafterweise Wellenlängen im Bereich 400 bis 450 nm verwendet.

Die sichtbare Bleichung des Bakteriorhodopsins unter Bestrahlung ist umso leichter zu detektieren, je höher die Lebensdauer des M-Zustands ist. Typischerweise erreicht man eine Bleichung von etwa 90 % des Bakteriorhodopsin-Materials mit Lichtleistungen kleiner als 100 mW/cm² bei 532 nm.

Bisher sind in der Literatur keine Zubereitungen, wie z.B. Lacke, Tinten oder Druckfarben für die Applikation mittels Drucktechnik und/oder die Anwendung im Bereich Sicherheitstechnik beschrieben, die Bakteriorhodopsin als photochrome Komponente enthalten. Gegenüber den genannten konventionellen photochromen Materialien liefert Bakteriorhodopsin folgende Vorteile:

1. Die Zahl der möglichen Schaltzyklen liegt höher als 10⁵.
2. Zum Farbwechsel kann Licht sichtbarer Wellenlänge eingesetzt werden.
3. Beide Schaltzustände weisen eine detektierbare Eigenfärbung auf.
- 20 4. Durch Anwendung gentechnischer Methoden lassen sich Bakteriorhodopsin-Funktionsvarianten durch Aminosäureaustausch herstellen. Die so gewonnenen Bakteriorhodopsin-Varianten unterscheiden sich entweder in ihrer Kinetik (BR-D96N) und/oder in ihrer Anfangsabsorption und ihrem Photozyklus (BR-D85N) vom Wildtyp-Bakteriorhodopsin.

In den Mikroorganismen der Gattung Halobacterium liegt Bakteriorhodopsin in der sogenannten Purpurmembran-Form vor. Herstellung und Isolierung des Bakteriorhodopsins in Purpurmembran-Form ist technisch wohlbekannt (vgl. z.B. EP 0 406 850 B1).

Bakteriorhodopsin-Sequenzvarianten, die auch Bakteriorhodopsin-Funktionsvarianten sein können, können in *Halobacterium salinarum* exprimiert werden. Dabei wird das Bakteriorhodopsin in die Zellmembran eingebaut, die dann isoliert werden kann. In einigen Fällen ist das erhaltene Material nicht zweidimensional kristallin, aber das Bakteriorhodopsin membrangebunden.

10 Bakteriorhodopsin wird im Wildtyp in Form eines zweidimensionalen Teils der Zellmembran vorgefunden, der ausschließlich aus Bakteriorhodopsin und Lipiden besteht. Dieser Teil wird Purpurmembran genannt. In dieser Form ist Bakteriorhodopsin thermodynamisch besonders stabil, für ein Protein sogar außergewöhnlich stabil. Dies ist Voraussetzung für eine Vielzahl technischer Anwendungen und auch im Bereich der erfindungsgemäßen Zubereitungen, wo Bakteriorhodopsin als Pigment eingesetzt wird. Deshalb wird besonders 15 bevorzugt die Purpurmembran-Form für die erfindungsgemäßen Zubereitungen eingesetzt.

Überraschenderweise wurde bei der Erzeugung von Bakteriorhodopsin-Varianten durch gezielten Austausch einzelner Aminosäuren festgestellt, daß bei Austausch von Aminosäuren in für die photochrome Funktion 20 unbedeutenden Bereichen Sequenzvarianten hergestellt werden können. Ein Aminosäureaustausch kann durch ortsgerechtete Mutagenese der für das Bakteriorhodopsin kodierenden Gene durchgeführt werden.

25 Hierdurch ist aber nun die Erschließung eines Hochsicherheitsmerkmals gegeben, denn der gezielte Aminosäureaustausch im Bakteriorhodopsin-Molekül kann zu Identifizierungszwecken verwendet werden und wird dadurch zum Sicherheitsmerkmal. Bei Austausch von z. B. nur vier Aminosäurepositionen mit den 20 biogenen Aminosäuren können $4^{20} \approx 10^{12}$ 30 unterscheidbare Bakteriorhodopsin-Materialien hergestellt werden.

Dadurch ist es ohne großen technischen Aufwand möglich, eine enorme Vielzahl von Bakteriorhodopsin-Molekülen herzustellen, die photochrom funktionell identische Bakteriorhodopsin-Materialien umfassen, sich aber voneinander in eindeutiger Weise, nämlich in ihrer Aminosäuresequenz,
5 unterscheiden.

Das zusätzliche Hochsicherheitsmerkmal kann nicht ohne aufwendige Analytik erkannt werden. Im Stand der Technik beschrieben sind verschiedene Verfahren, mit denen die Zusammensetzung von Bakteriorhodopsin-Materialien mit den genannten Modifikationen noch zuverlässig detektiert werden kann. Allen voran ist hier die Massenspektroskopie zu nennen (vgl. K. L. Schey, D. I. Papac, D. R. Knapp und R. K. Crouch, Matrix-Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry of Rhodopsin and Bacteriorhodopsin, Biophys., J. 63 (1992), 1240 - 1243, 10 P. Hufnagel, U. Schweiger, C. Eckerskorn und D. Oesterhelt, Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Genetically and Chemically modified Bacteriorhodopsins, Anal. Biochem. 243 (1996) Nr. 1, 46 - 54, L. E. Ball, J. E. Jr. Oatis, K. Dharmasiri, M. Busman, J. Wang, L. B. Cowden, A. Galijatovic, N. Chen, R. K. Crouch and D. R. Knapp, Mass Spectrometric 15 Analysis of Integral Membrane Proteins: Application to Complete mapping of Bacteriorhodopsins and Rhodopsin, Protein Sci. 7 (1998) Nr. 3, 758 - 764). Die bevorzugten Bakteriorhodopsin-Materialien kombinieren ein Niedrigsicherheitsmerkmal, nämlich die optisch leicht zu detektierende Photochromie, mit einem Hochsicherheitsmerkmal, z. B. eine 20 Sequenzvariation in der Aminosäuresequenz des Bakteriorhodopsins selbst.
25

Zu den von der Erfindung umfassten Niedrigsicherheitsmerkmalen zählen
1. verschiedene Anfangsfärbungen der Bakteriorhodopsin-Materialien,
2. verschiedene Photozyklen,
30 3. verändertes kinetisches Verhalten.

Das erfindungsgemäße Niedrigsicherheitsmerkmal kann unter Einsatz von Bakteriorhodopsin-Funktionsvarianten erreicht werden, kann aber auch durch Bakteriorhodopsin-Derivatisierungsvarianten und/oder Bakteriorhodopsin-Chromophorvarianten erreicht werden.

5

Unter Bakteriorhodopsin-Funktionsvarianten sollen insbesondere Varianten verstanden werden, die sich in ihrem Absorptionsspektrum und/oder ihrem Photozyklus vom Bakteriorhodopsin-Wildtyp unterscheiden.

10

Eine bekannte Funktionsvariante ist z.B. die Variante D96N, bei der die Asparaginsäure an Position 96 durch Asparagin ausgetauscht ist. Diese Bakteriorhodopsin-Funktionsvariante und einige weitere sind beschrieben bei: "H. Otto, T. Marti, M. Holz, T. Mogi, M. Lindau, H. G. Khorana und M. P. Heyn, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86 (1989), S. 9228-9232" und "T. E. Thorgeirsson, S. J. Milder, L. J. W. Miercke, M. C. Betlach, R. F. Shand, R. M. Stroud und D. S. Klier, Biochemistry 30 (1991), S. 9133-9142".

15

Unter Bakteriorhodopsin-Derivatisierungsvarianten sollen insbesondere Bakteriorhodopsin-Varianten verstanden werden, die sich vom Wildtyp durch die kovalente Ankopplung von Molekülen unterscheiden. Solche Moleküle können beispielsweise die Aufgabe haben, das Molekulargewicht von Bakteriorhodopsin zu vergrößern, um in der Massenspektroskopie ein derartiges Molekül identifizieren zu können oder ein farbiges Molekül sein, um so das Absorptionsspektrum des Bakteriorhodopsins zu verändern, oder ein fluoreszierendes Molekül sein, um so eine an das Bakteriorhodopsin-gekoppelte Fluoreszenz beobachten zu können. Ebenso kann das Bakteriorhodopsin-Material auch an ein Polymer kovalent gekoppelt sein. Die Kopplungsreaktion kann z.B. nach Chignell & Chignell, Biophys. Biochem. Res. Commun. 62 (1975), S. 136-143 und nach Renthal et al., Biochemistry 22 (1983), S. 5-12 durchgeführt werden.

20

25

30

Es können Linkmoleküle an das Bakteriorhodopsin gekoppelt werden, die es erlauben, an diese wiederum weitere Verbindungen anzukoppeln. Moleküle, die zu den erfindungsgemäßen Aufgaben angekoppelt werden können, dienen dazu, das Molekulargewicht von Bakteriorhodopsin zu vergrößern,
5 um in der Massenspektroskopie ein derartiges Molekül identifizieren zu können.

Unter Bakteriorhodopsin-Chromophor-Varianten sollen insbesondere Bakteriorhodopsin-Varianten verstanden werden, die sich vom Wildtyp
10 durch die Entfernung bzw. den Austausch der chromophoren Retinyliden-Gruppe durch ein anderes Molekül, sogenannte Retinal-analoge Moleküle, unterscheidet. Das Retinal-analoge Molekül kann kovalent über Lysin-216 an Bakteriorhodopsin gebunden sein.

15 Unter Bakteriorhodopsin-Isotopenvarianten sollen insbesondere solche Bakteriorhodopsin-Varianten verstanden werden, bei denen einige oder alle Aminosäuren teilweise oder vollständig mit ^{13}C oder ^{15}N markiert sind. Dies kann dadurch erreicht werden, daß einige markierte Aminosäuren dem Wachstumsmedium zugesetzt werden oder Pepton eingesetzt wird, das als
20 Ganzes markiert wird. Mittels hochauflösender NMR können die so markierten Verbindungen identifiziert werden.

Unter Bakteriorhodopsin-Spin-Label-Varianten sollen insbesondere solche Bakteriorhodopsin-Varianten verstanden werden, die ein Spin-Label-Kovalent
25 an das Bakteriorhodopsin-Molekül gebunden enthalten. Dies kann z. B. dadurch erreicht werden, daß ein Derivat von TEMPO (2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-N-oxyl) oder DOXYL (4,4-Dimethyloxazolidin-N-oxyl) oder PROXYL (2,2,5,5-Tetramethylpyrrolidin-N-oxyl) kovalent an das Bakteriorhodopsin-Material gekoppelt wird. Mittels ESR kann die
30 Anwesenheit und Art des Spin-Labels geprüft werden.

Unter Bakteriorhodopsin-Sequenzvarianten sollen insbesondere solche Bakteriorhodopsin-Varianten verstanden werden, die sich vom Wildtyp durch den Verlust oder den Austausch oder die Hinzufügung einer oder mehrerer Aminosäuren unterscheiden, die aber nicht zu einer wesentlichen Beeinflussung des Photozyklus führen. Sequenzvarianten von Bakteriorhodopsin sind z. B. D36C oder Varianten, bei denen am N-Terminus oder C-Terminus Aminosäuren angehängt werden. Die Kombination der Modifikationen der oben genannten Varianten führt zu neuen, bevorzugten Varianten, wodurch eine enorme Vielzahl an verschiedenen Bakteriorhodopsin-Zubereitungen möglich wird. Dadurch wird ein Hochsicherheitsmerkmal erhalten, da der Aufwand für die Analyse sehr hoch wird und gleichzeitig jede einzelne Charge aufgrund der großen Vielfalt eindeutig identifiziert werden kann.

Der anfängliche Farbeindruck des Bakteriorhodopsin-Materials sowie der Farbeindruck des gebleichten Zustandes können durch kovalente Ankopplung geeigneter Farbstoffe an die Bakteriorhodopsin-Moleküle stark beeinflußt werden. Der visuelle Eindruck der entstehenden Farbmischungen läßt sich im CIE-Diagramm leicht anschaulich visualisieren. Der Fachmann kann die Farbwirkung mit bekannten Methoden solcher Art bestimmen.

Die Bakteriorhodopsin-Zubereitung kann weiterhin neben Bakteriorhodopsin ein herkömmliches, nicht photochromes Pigment, oder/und ein Fluorochrom oder/und ein an Bakteriorhodopsin kovalent gebundenes Pigment oder/und ein weiteres photochromes Pigment enthalten. Durch die Mischung mit Bakteriorhodopsin kann das nichtphotochrome Pigment oder Fluorochrom innerhalb der Sicherheitsmarkierung verborgen sein. Bei einer solchen Ausführungsform kann es weiterhin zweckmäßig sein, zusätzlich zum sichtbaren Licht UV-Licht zu verwenden.

Des weiteren lassen sich fluoreszierende oder phosphoreszierende Moleküle an die Bakteriorhodopsin-Moleküle koppeln, wodurch deren Emission ein

zusätzliches Merkmal darstellt. Durch geeignete Wahl der Lage der Emission kann eine Unterdrückung der Fluoreszenz erzielt werden, wenn sich das Bakteriorhodopsin-Material im ungebleichten Zustand befindet. Dies wird erreicht, wenn die Lage der anfänglichen Bakteriorhodopsin-Absorption und 5 der Emission des fluoreszierenden oder phosphoreszierenden Materials stark überlappt. In diesem Fall absorbiert das Bakteriorhodopsin-Material die emittierten Photonen und mit bloßem Auge ist dann keine Fluoreszenz wahrnehmbar. Die Fluoreszenz wird erst dann sichtbar, wenn das Bakteriorhodopsin-Material photochemisch gebleicht wird.

10 Wie erwähnt, sind weitere Möglichkeiten zur Herstellung von Bakteriorhodopsin-Varianten durch Ersetzen der chromophoren Retinyliden-Gruppe möglich. Hierbei wird eine Modifikation der photophysikalischen Eigenschaften erreicht, wobei bevorzugt Dihydroretinal oder 4-Ketoretinal 15 zum Einsatz kommen können.

Die Prüfung der Zusammensetzung des applizierten Bakteriorhodopsin-Materials kann durchgeführt werden, indem mittels mikroanalytischer Sequenzierung die Aminosäuresequenz des Bakteriorhodopsin-Materials 20 ganz oder teilweise bestimmt wird oder indem mittels immunologischer Verfahren die Reaktion mit einem spezifischen Antikörper gemessen wird.

Bakteriorhodopsin-Materialien, die Hochsicherheitsmerkmale umfassen, enthalten vorzugsweise Bakteriorhodopsin-Varianten

25 1. mit gezielt veränderten Aminosäuresequenzen, wobei die Sequenzänderung nicht die photophysikalischen Eigenschaften beeinflußt,

2. mit kovalent angekoppelten Molekülen und

3. mit Aminosäuren, die mit ^{13}C und/oder ^{15}N und/oder anderen Isotopen 30 markiert sind.

Besonders bevorzugt sind Kombinationen aus zwei oder mehr der obigen Bakteriorhodopsin-Variantentypen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Bakteriorhodopsin nach Anspruch 16 mit bevorzugten Ausgestaltungen nach den Ansprüchen 17 bis 19. Solche Bakteriorhodopsine sind in dem zur Ausbildung der Purpurmembran-Form des Proteins notwendigen Bereich gegenüber dem
5 Bakteriorhodopsin-Wildtyp unverändert. Unter Purpurmembran wird der aus Halobakterien isolierbare zweidimensionale Kristall aus Bakteriorhodopsin und Lipiden verstanden. Ausreichend für die Zwecke dieser Erfindung ist es auch, wenn das Bakteriorhodopsin trotz geringfügiger Änderungen in diesem Bereich weiterhin zur Ausbildung einer Purpurmembran fähig ist.

10 Die erfindungsgemäßen Änderungen in der Aminosäuresequenz umfassen Aminosäureaustausche, wie z. B. Deletion, Insertion, Substitution und/oder Addition in der gesamten Polypeptidkette. Besonders bevorzugt sind
15 Additionen von Aminosäuren an den N- oder/und C-Termini oder/und den insbesondere außerhalb der Membran liegenden Schleifen der Polypeptidkette. Die erfindungsgemäß durchgeführten Änderungen zur Kodierung des Hochsicherheitsmerkmals werden somit nicht in dem Bereich des Bakteriorhodopsins durchgeführt, der die photochromen Eigenschaften beeinflußt. Der Aminosäureaustausch in den Schleifen und/oder dem C-
20 Terminus oder/und dem N-Terminus der Polypeptidkette führt nicht zu einer Änderung der photochromen Eigenschaften des Ausgangs-Bakteriorhodopsins. An dieser Stelle soll festgehalten werden, daß als Ausgangs-Bakteriorhodopsin sowohl ein Bakteriorhodopsin des Wildtyps als
25 auch ein bereits modifiziertes Bakteriorhodopsin, insbesondere BR-D96N, verwendet werden kann.

Die zur Analyse einsetzbaren Aminosäureaustausche bewirken bevorzugt Massenänderungen des Bakteriorhodopsin-Moleküls von mindestens einem Dalton, noch bevorzugter mindestens 10 Dalton, und am meisten bevorzugt
30 100 Dalton. Zur Analyse werden Geräte und Ionisationsverfahren des Standes der Technik, wie z. B. FTMS und/oder TOF und/oder MALDI und/oder ESI eingesetzt.

Die Addition/Insertion von Aminosäuren kann insbesondere bis zu 1000 zusätzliche Aminosäuren umfassen, bevorzugt bis zu 100 Aminosäuren, besonders bevorzugt bis zu 50 Aminosäuren, und mindestens eine, am meisten bevorzugt 5 bis 20 Aminosäuren. Eine Addition von mindestens 6 Histidin-Resten am C-Terminus kann zu einer vorteilhaften Reinigung der Bakteriorhodopsin-Variante mittels herkömmlicher Metallchelatsäulen eingesetzt werden.

Die Deletion oder Substitution betrifft insbesondere 1 bis 10 und besonders bevorzugt 1 bis 4 Aminosäuren.

Als Substitutionsvariante bevorzugt eingesetzt wird die Bakteriorhodopsin-Variante, deren Asparaginsäurerest in Position 36 durch einen Cysteinrest ersetzt ist (BR-Variante D36C).

Die Molekulargewichte der Aminosäuresequenzvarianten der Bakteriorhodopsin-Moleküle lassen sich durch Massenspektroskopie mit ESI oder MALDI-TOF bestimmen. Nach Rückrechnung der Massenspektren erhält man die Molmassen der untersuchten Substanzen mit bis zu einer Auflösung von einer Massenzahl. Bei der Änderung der Aminosäuresequenz, z.B. auch durch Deletion oder Insertion, kommt es zu vergleichsweise großen Massenzahländerungen, die analytisch gut detektierbar sind. Selbst wenn nur einige wenige Aminosäuren durch andere Aminosäuren ersetzt werden, sind die resultierenden Massenänderungen analytisch ausreichend.

An Bakteriorhodopsin-Moleküle kovalent angekoppelte Moleküle bieten eine weitere Option von Hochsicherheitsmerkmalen. Durch die Kopplung von Molekülen wird eine weitere Analysedimension ermöglicht, beispielsweise über den Nachweis bestimmter Eigenschaften der angekoppelten Moleküle oder über deren Masse. Angekoppelte Moleküle können z.B. Biotin und/oder Avidin oder/und Digoxygenin sein. Außerdem kann man Moleküle ankoppeln, die massenspektroskopisch separat nachgewiesen werden

können. Die Ankoppelung von Spinlabelmolekülen, wie z.B. TEMPO, DOXYL oder PROXYL, kann in einer ESR-Analyse, die auch mit Einschränkungen unter Einsatz eines Feststoffs durchgeführt werden kann, ermittelt werden. Mit den stabilen Isotopen ^{13}C und ^{15}N markierte Aminosäuren können durch
5 NMR-Analyse detektiert werden. (M. Engelhard, B. Hess, G. Metz, W. Kreutz, F. Siebert, J. Soppa und D. Oesterhelt, High resolution carbon-13-solid state NMR of bacteriorhodopsin: assignment of specific aspartic acids and structural implications of single site mutations, Eur. Biophys. J. 18 (1990), 17-24).

10 Hochsicherheitsmerkmale zur Authentizitätsprüfung können überraschenderweise auch durch Verwendung von polymeren Molekülen, deren Monomerensequenz bekannt ist und die gegebenenfalls an Bakteriorhodopsinmoleküle angekoppelt sind, erhalten werden. Als polymere
15 Moleküle können dabei z.B. Oligopeptide, Polypeptide, Proteine, Nukleinsäuren, peptidische Nukleinsäuren (PNAs) oder auch synthetische, nicht in der Natur vorkommende Polymere eingesetzt werden. Die Polypeptide und Proteine können dabei Nicht-Proteinanteile, die NukleinsäurenNicht-Nukleinsäure-Anteile enthalten. Die Nicht-Proteinanteile
20 und die Nicht-Nukleinsäure-Anteile können z. B. Glykosidanteile, Biotin oder/und Digoxigenin oder/und Avidin umfassen.

Die an Bakteriorhodopsin als Hochsicherheitsmerkmal angekoppelten polymeren Moleküle, wie z.B. DNA- oder/und RNA- oder/und PNA-Moleküle
25 oder/und Hybride aus den genannten Molekülsorten können z.B. durch geeignete Amplifikationsreaktionen, wie der PCR-Reaktion mittels spezifischer Primer, detektiert werden. Die Detektion kann hierbei die gelelektrophoretische Größenanalyse aber auch die direkte Nukleinsäurebasensequenzbestimmung umfassen. Polypeptide können in
30 ähnlicher Weise durch mikroanalytische Sequenzbestimmung analysiert und detektiert werden. Aufgrund der Möglichkeiten, die die organische Synthese

von Nukleinsäuren und Polypeptiden bietet, können auch nicht in der Natur vorkommende Sequenzen zum Einsatz kommen.

Eine Kombination von Niedrigsicherheitsmerkmalen und Hochsicherheitsmerkmalen bietet weitere Vorteile. Eine solche Kombination kann beispielsweise dadurch erhalten werden, daß die photochrome Eigenschaft von Bakteriorhodopsin als Niedrigsicherheitsmerkmal mit einem der oben genannten Hochsicherheitsmerkmalen kombiniert wird. Besonders vorteilhaft ist es, hierzu Bakteriorhodopsin gemeinsam mit einem polymeren Molekül zu verwenden. Dabei kann das Bakteriorhodopsin bzw. eine Bakteriorhodopsin-Variante selbst als analysierbares polymeres Molekül verwendet werden. Trotz enormer Variabilität sind die Sicherheitsmerkmale untrennbar miteinander verbunden. Daneben ist es möglich, zusätzlich zum Bakteriorhodopsin als photochromem Material davon verschiedene Polymere in freier Form zu verwenden.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Sicherung der Authentizität von Gegenständen umfaßt die Applikation einer photochromen Zubereitung in Form einer Tinte oder Druckfarbe auf dem jeweiligen Gegenstand. Die erfindungsgemäße photochrome Zubereitung enthält dabei neben Bakteriorhodopsin der Wildtypform oder/und mindestens einer Bakteriorhodopsin-Variante als photochromen Anteil gegebenenfalls geeignete Hilfsstoffe und/oder geeignete Matrixmaterialien.

Die Hilfsstoffe werden eingesetzt für den Applikationsprozeß: Zur Vermeidung der Schaumbildung und zur Verbesserung der Benutzungseigenschaften oder/und für die Stabilität: Zur Mikroverkapselung der Zubereitungsmaterialien und zur Abschirmung von UV-Strahlen oder/und für die Verbesserung des visuellen optischen Eindrucks: Zur Beeinflussung des Absorptionsspektrums, z.B. im ungebleichten und gebleichten Zustand von Bakteriorhodopsin-Material.

Geeignete Matrixmaterialien werden eingesetzt zur Fixierung des Zubereitungsmaterials durch physikalischen Einschluß oder/und kovalente Koppelung an das Matrixmaterial oder/und nachträgliche Quervernetzung des Zubereitungsmaterials bzw. des Matrixmaterials mittels chemischer oder photochemischer Methoden. Die Quervernetzung kann dabei eine Behandlung mit Glutaraldehyd, Transglutaminase, (radikalische) Polymerisation oder/und eine photochemische Quervernetzung umfassen.

Die Applikation der erfindungsgemäßen photochromen Zubereitung kann mittels bekannter drucktechnischer Verfahren erfolgen, wie z.B. Offset-, Sieb-, Inkjet-, oder Tampondruck durch mechanischen Auftrag mittels Pinsel, durch Sprühen, Tauchen oder Elektrophorese. Das erfindungsgemäße Bakteriorhodopsin-Material kann durch anschließende Trocknung verfestigt und das synthetische oder biologische Matrixmaterial durch eine Nachbehandlung unlöslich gemacht werden. Appliziert werden kann die Zubereitung selbst oder ein Hilfssubstrat auf dem die Zubereitung aufgebracht ist. Die Bakteriorhodopsin-Zubereitung kann in mikroverkapselter Form vorliegen. Mikroverkapselte Farbzubereitungen sind für Druckverfahren besonders geeignet.

Die Zubereitung kann auf jeden beliebigen Gegenstand appliziert werden. Gegenstände von besonderem Interesse sind z.B. Dokumente, Wertpapiere, Banknoten, Kunstwerke, Ausweise, Kleidungsstücke, Kraftfahrzeuge, Prüfzeichen, Qualitätssiegel, etc.

Die erfindungsgemäße Tinte nach einem der Ansprüche 20 bis 24 kann mit dem Fachmann bekannten herkömmlichen Farbstoffen in Kombination verwendet werden. Die Bakteriorhodopsin-Materialien enthaltende Tinte nach der Erfindung kann wie herkömmliche Tinte verwendet werden und ist außer zur Sicherung der Authentizität von Gegenständen z.B. auch zur Dekoration und für sonstige Spezialeffekte einsetzbar.

Unter Tinte wird hier auch jede gefärbte Schreibflüssigkeit/Druckflüssigkeit und ggf. pulverisiertes Applikationsmedium verstanden. Unter den Begriff Tinte fallen auch Druckfarben und andere Farbzusammensetzungen, die zum Bedrucken von Gegenständen eingesetzt werden können oder die allgemein 5 Verwendung bei der Erzeugung von Drucken finden. Bei Verwendung der Bakteriorhodopsin-Materialien als Tinte können als Lösungsmittel Wasser oder andere Lösungsmittel, wie z. B. solche auf Alkoholbasis, verwendet werden. Durch die Verwendung von mindestens zwei Bakteriorhodopsin-Varianten ergeben sich für eine Analyse vorteilhafte Effekte, dadurch daß 10 die Analyse zweidimensional durchführbar ist. Neben der bevorzugten Purpurmembranform des Bakteriorhodopsins kann die erfindungsgemäße Tinte zusätzlich Bakteriorhodopsin in solubilisierter Form enthalten.

Bakteriorhodopsin in solubilisierter Form läßt sich gewinnen, indem das 15 Bacterio-opsin-Gen in einem Wirt wie z.B. E. coli exprimiert wird und mit zugesetztem Retinalaldehyd rekonstituiert wird. Eine weitere Möglichkeit ist, daß Bakteriorhodopsin aus Purpurmembran durch Entfernen der Lipide 20 gewonnen wird. Dazu wird beispielsweise eine Purpurmembran-Suspension ($OD_{570} < 5$) in Wasser oder Puffer mit 1% Triton-X 100 versetzt und 1 h mit einer Mikrosonde eines Sonifiers kontinuierlich beschallt. Der nach dem Abzentrifugieren erhaltene Überstand enthält Bakteriorhodopsin in solubilisierter Form.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren nach Anspruch 25 zur Markierung 25 eines Gegenstandes unter Verwendung einer photochromen Zubereitung. Weiterbildungen des letztgenannten Verfahrens sind in den Ansprüchen 26 bis 28 angegeben.

Unter einem weiteren Gesichtspunkt der Erfindung wird ein Gegenstand mit 30 einer Markierung angegeben, welche Bakteriorhodopsin enthält. Diese Markierung wird vorzugsweise hergestellt nach einem Verfahren nach einem

der Ansprüche 1 bis 15 oder 25 bis 28. Die Markierung enthält vorzugsweise eine Tinte nach einem der Ansprüche 20 bis 24.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele in Verbindung mit den
5 Abbildungen 1 und 2 näher erläutert.

Abbildung 1 zeigt den Ablauf eines Verfahrens zur Authentizitätsprüfung.

Abbildung 2 zeigt einen Kopievorgang unter Verwendung eines
10 Sicherheitsmerkmals.

Beispiel 1: Niedrigsicherheitsmerkmal-Prüfung

Für den Anwender leicht zu prüfen sind die photochromen Eigenschaften
15 von Bakteriorhodopsin (Abbildung 1). Ein auf einem Dokument 1, wie
beispielsweise einer Banknote, einem Wertpapier, einem Kunstwerk oder
einem anderen wertvollen Gegenstand appliziertes Merkmal 2, hergestellt
aus den beanspruchten Materialien und Zubereitungen, das die Variante
D96N des Bakteriorhodopsins enthält, läßt sich z.B. dadurch prüfen, daß es
20 bei Bestrahlen mit Licht 3 einer Leuchtdiode mit einem Emissionsmaximum
im grünen oder gelben Bereich seine Farbe von purpur nach gelb ändert.
Dies ist besonders leicht zu erkennen in 4, wenn nicht die ganze Fläche
bestrahlt wird. Ohne weiteres Zutun, kehrt nach einigen Sekunden bis
Minuten, je nach verwendeter Zubereitung, die purpurne Farbe zurück und
25 der Anfangszustand ist wiederhergestellt. Alternativ kann durch Bestrahlen
mit Licht 5 einer Leuchtdiode mit einem Emissionsmaximum im Blaubereich
die purpurne Farbe sofort wiederhergestellt werden. Der technische
Aufwand für die Prüfung ist minimal. Der Anwender kann mit dem bloßen
Auge die Farbänderung verfolgen, der Meßprozeß läßt sich aber auch
30 maschinell durchführen.

Beispiel 2: Kopierschutz

Ein Dokument 1, das ein erfindungsgemäßes Merkmal 2 enthält, bei dem eine bestimmte Menge lichtempfindlichen Bakteriorhodopsin-Materials, z.B. der Wildtypform des Bakteriorhodopsins, und ein Bakteriorhodopsin-Material mit höherer Lichtempfindlichkeit, z.B. der Bakteriorhodopsin-Variante D96N kombiniert eingesetzt werden, weist im unbelichteten Zustand eine einheitliche Fläche gleicher Färbung auf (Abbildung 2). Statt des unempfindlichen Bakteriorhodopsin-Materials kann auch ein geeigneter Farbstoff gleicher Färbung verwendet werden. Wird dieses Dokument mit Hilfe eines Photokopierers 3 vervielfältigt, so wird durch die Bestrahlung mit Licht während des Kopievorgangs das lichtempfindliche Bakteriorhodopsin-Material stärker gebleicht als das umgebende Material geringerer Lichtempfindlichkeit. Deshalb wird die Kopie 4 ein Niedrigsicherheitsmerkmal 5 aufweisen, bei dem dauerhaft das Merkmal seine unterschiedliche Färbung behalten wird. Hieran wird die Kopie eindeutig als Kopie zu erkennen sein.

Beispiel 3: Nachträgliche Behandlung, Hilfsstoffe und Applikationsverfahren

a) Nachträgliche Quervernetzung

Ein Substrat mit einer getrockneten photochromen Schicht, bestehend aus dem Matrixmaterial und dem Bakteriorhodopsin, wurde für 15 Minuten mit einer 40% Glutardialdehydlösung überschichtet. Danach wurde die Glutardialdehydlösung mit Wasser abgewaschen. Die photochrome Schicht ist durch die Behandlung wasserunlöslich geworden.

b) Photochemisch

10 mg Purpurmembran (BR-D96N) wurden in 4 ml einer UV-härtenden Farbe (IFS3000, Fa. Schmitt) fein verteilt. Nach

Applikation der Mischung mittels einer Rakel erfolgte die Aushärtung über Nacht unter UV-Licht.

c) Applikation

5

Siebdruck

10

Das Prinzip des Siebdrucks ist Durchdruck, ähnlich einer Schabloniertechnik. Die Druckform besteht aus einem Siebgewebe, welches mit einer farbundurchlässigen Sperrsicht versehen wird. Das Druckmotiv bleibt offen. Der Druck erfolgt durch das Abziehen des mit Farbe gefüllten Siebes mit einer Rakel. Die Farbe wird dabei auf das darunterliegende Substrat übertragen. Zur Herstellung einer Siebdruckfarbe wurden in eine 7,2% PVA-Lösung (Mowiol Typ 56-98) 100 mg/ml Pigment (Bakteriorhodopsin-Wildtyp) über Nacht eingerührt. Bei Übereinstimmung der rheologischen Eigenschaften mit einer Standardprobe konnte die erhaltene Mischung mit einer herkömmlichen Siebdruckmaschine verdrückt werden.

15

20

Offsetdruck

In 5 ml einer Farbe ohne Pigment (Fa. Schmitt, IUF01) wurden bei 50°C 1 g Purpurmembran (BR-D96N) eingerührt. Die so erhaltene Mischung konnte mittels gängiger Offset-Technik verdrückt werden.

25

d) Mechanischer Schutz

Laminieren

30

Die auf ein Substrat applizierte photochrome Mischung, die Bakteriorhodopsin enthält, wurde mit einem Heißlaminiergerät (GPM, Mylam 9) mit einer

Folientasche vom Typ GHQ-120TR bei einer Temperatur von 90 - 140°C einlaminiert.

e) Hilfsstoffe

5

Vermeidung der Schaumbildung

PVA (Typ Mowiol 56-98, 68 mg/ml) wurde bei 50°C in Wasser gelöst. Zu dieser Mischung wurde Purpurmembran in gefriergetrockneter Form hinzugegeben, so daß eine Konzentration von 11 mg/ml erhalten wurde. In diese Mischung wurde bei Raumtemperatur 1-Octanol (1% (V/V)) untergerührt. Die so erhaltene Mischung hatte verbesserte Eigenschaften beim Druckauftrag bezüglich der Blasenbildung.

15

Abschirmung von UV-Strahlung

20

Zum Schutz des photochromen Pigments wurde die Mischung mit einem der folgenden UV-Absorber oder einem Derivat davon in Konzentration von 1 - 30%, bevorzugt 3 - 10% w/w versetzt: Benzophenon, Hydroxynaphthochinon, Phenylbenzoxazol, Zimtsäureester, Sulfonamid, Aminobenzoesäureester.

Beispiel 4

25

Ein Gebrauchsdokument wie z.B. ein Geldschein, der mit der Bakteriorhodopsin enthaltenen Sicherheitsmarkierung versehen ist. Bei Belichtung verändert die Sicherheitsmarkierung ihre Farbe von Violett nach Gelb. Nach einer kurzen Zeit (ca. 30 - 60 s) und/oder bei Belichtung mit Licht des blauen Wellenlängenbereichs kehrt die ursprünglich violette Farbe wieder zurück. Ein solches Gebrauchsdokument wäre gegen eine unerlaubte Vervielfältigung bzw. eine Fälschung gesichert.

30

Beispiel 5

Wie Beispiel 4, es erfolgt jedoch unter Belichtung mit Licht des blauen Wellenlängenbereichs ein Farbwechsel von Gelb nach Violett. Nach der Belichtung kehrt die ursprüngliche Farbe durch das Umgebungslicht zurück.

Beispiel 6

Ein Dokument, wie z.B. ein Vertrag, der mit einem violetten Balken versehen ist. Dieser Balken wird durch zweimaliges Drucken mit zwei Schablonen, die sich wie Positiv und Negativ verhalten, hergestellt. Durch die Verwendung dieser beiden Schablonen ist es möglich, zwei Farbzubereitungen zu verwenden, die sich in ihrer Lichtsensitivität unterscheiden. Bei Belichtung mit Weißlicht verfärbt sich die lichtsensitivere Schicht von Violett nach Gelb, während die andere Schicht sich nicht verfärbt oder nur sehr schwach verfärbt. Dabei entsteht ein Farbkontrast. Damit ist es möglich, aus der vorher homogenen Fläche ein Wort (z.B. Original) oder jede beliebige andere Zeichenfolge und/oder Piktogramme hervorzuheben.

Beispiel 7

Wie 6, es wird jedoch auf normales bzw. Photopapier gedruckt, das hinterher einlaminiert werden kann. An einem Markenartikel (Kleidungsstücke, wie z.B. Jeans o. ä.) befestigt bzw. als Beigabe zu einem Markenartikel, kann es dann dessen Authentizität sicherstellen und somit Produktpiraterie vorbeugen.

Beispiel 8

Um ein Dokument vor der unerlaubten Vervielfältigung durch Kopieren zu schützen, wird wie bei 6 mit zwei Schablonen eine homogen erscheinende Fläche erzeugt. Ein Teil der homogenen Fläche vollzieht beim Kopieren einen

Farbwechsel, so daß die Kopie durch eine inhomogene Fläche gekennzeichnet ist.

Ansprüche

1. Verfahren zur Sicherung der Authentizität von Gegenständen, wobei eine photochrome Zubereitung in Form einer Tinte enthaltend Bakteriorhodopsin als photochromen Anteil auf den Gegenstand appliziert wird, wobei die Bestrahlung dieser photochromen Zubereitung mit Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich zu einer Zustandsänderung führt, die zum Zwecke der Authentizitätsprüfung detektierbar ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die detektierbare Zustandsänderung reversibel ist.
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei eine Authentizitätsprüfung durch Bestrahlung der photochromen Zubereitung mit sichtbarem Licht erfolgt, um das Bakteriorhodopsin zu bleichen und wobei die thermische Relaxation in den ungebleichten Zustand mit dem bloßen Auge oder einem Meßgerät beobachtet wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei zur Authentizitätsprüfung die Stimulierung einer Ausbleichreaktion des Bakteriorhodopsins durch Bestrahlung der photochromen Zubereitung mit Licht eines ersten Wellenlängenbereiches erfolgt, wobei die photochrome Zubereitung daraufhin mit Licht eines zweiten Wellenlängenbereiches bestrahlt wird, um das Bakteriorhodopsin photochemisch in den Ausgangszustand zurückzuführen.
5. Verfahren zur Sicherung der Authentizität von Gegenständen, wobei Bakteriorhodopsin und polymere Moleküle auf den Gegenstand appliziert werden und zur Authentizitätsprüfung eine Analyse des Bakteriorhodopsins und/oder der polymeren Moleküle durchgeführt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die polymeren Moleküle an das Bakteriorhodopsin gekoppelt sind.
- 5 7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei als Bakteriorhodopsin eine Bakteriorhodopsin-Variante, ausgewählt aus Funktionsvarianten, Sequenzvarianten, Derivatisierungsvarianten, Chromophorvarianten, Isotopenvarianten oder/und Spin-Label-Varianten verwendet wird.
- 10 8. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die polymeren Moleküle Polypeptide sind, die ggf. Nicht-Peptid-Anteile aufweisen können.
- 15 9. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die polymeren Moleküle Nukleinsäuren und/oder Derivate davon umfassen, die ggf. Nicht-Nukleinsäureanteile aufweisen können.
- 20 10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die an das Bakteriorhodopsin gekoppelten Nukleinsäuren und/oder deren Derivate durch geeignete Amplifikationsreaktionen detektiert werden.
- 25 11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die Sequenz der Amplifikationsprodukte bestimmt wird.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei geeignete Hilfsstoffe eingesetzt werden für
 - a) den Applikationsprozeß: zur Vermeidung der Schaumbildung und zur Verbesserung der Benetzungseigenschaften oder/und
 - b) die Stabilität: zur Mikroverkapselung der Zubereitungs-Materialien und zur Abschirmung von UV-Strahlung oder/und
 - c) die Verbesserung des visuellen optischen Eindrucks: zur Beeinflussung des Absorptionsspektrums von Bakteriorhodopsin-Material.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei geeignete Matrixmaterialien eingesetzt werden zur Fixierung des Zubereitungs-Materials durch

- physikalischen Einschluß oder/und
- 5 kovalente Kopplung an das Matrixmaterial oder/und
- nachträgliche Quervernetzung des Zubereitungsmaterials des Matrixmaterials.

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Applikation mittels bekannter drucktechnischer Verfahren, wie z.B. Offset-, Sieb-, Inkjet- oder Tampondruck, durch mechanischen Auftrag mittels Pinsel, durch Sprühen, Tauchen oder Elektrophorese erfolgt.

15. 10 Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Zubereitung selbst oder ein Hilfssubstrat, auf dem die Zubereitung aufgebracht ist, auf den Gegenstand appliziert wird.

16. 15 Bakteriorhodopsin mit den Merkmalen

- 20 der zur Ausbildung der Purpurmembran-Form des Proteins notwendige Bereich gegenüber dem Bakteriorhodopsin-Wildtyp ist unverändert,
- b) in Schleifen oder/und dem C-Terminus oder/und dem N-Terminus der Polypeptidkette ist mindestens ein Aminosäure-Austausch gegenüber dem Bakteriorhodopsin-Wildtyp vorhanden, umfassend Deletionen, Additionen, Insertionen und/oder Substitutionen, wobei diese Aminosäure-Austausche nicht zu einer Änderung der durch den photochromen Bereich bestimmten photochromen Eigenschaften des Bakteriorhodopsins führen.

17. Bakteriorhodopsin nach Anspruch 16, wobei am C-Terminus mindestens eine Aminosäure addiert ist.
18. Bakteriorhodopsin nach einem der Ansprüche 16 bis 17, wobei die Bakteriorhodopsin-Variante mindestens ein Cystein enthält.
19. Bakteriorhodopsin nach einem der Ansprüche 16 bis 18, welches einen vom Wildtyp verschiedenen Photozyklus oder eine vom Wildtyp verschiedene Anfangsfarbe besitzt.
20. Tinte, umfassend ein Bakteriorhodopsin der Wildtypform und/oder mindestens eine Bakteriorhodopsin-Variante.
21. Tinte nach Anspruch 20, umfassend ein Bakteriorhodopsin nach einem der Ansprüche 16 bis 19.
22. Tinte nach Anspruch 20 oder 21, umfassend mindestens eine Bakteriorhodopsin-Variante vom Typ Funktionsvariante, Sequenzvariante, Derivatisierungsvariante, Chromophorvariante, Isotopenvariante oder/und Spin-Label-Variante.
23. Tinte nach einem der Ansprüche 20 bis 22, umfassend mindestens zwei Bakteriorhodopsin-Varianten.
24. Tinte nach einem der Ansprüche 20 bis 23, weiterhin enthaltend ein Fluorochrom, ein Pigment oder/und ein weiteres photochromes Pigment.
25. Verfahren zur Markierung eines Gegenstandes unter Verwendung einer photochromen Zubereitung enthaltend ein Bakteriorhodopsin, wobei die photochrome Zubereitung auf den Gegenstand aufgebracht wird, anschließend durch Trocknung verfestigt wird und mittels eines

Matrixmaterials fixiert wird, wobei durch Belichtung ein Farbwechsel der photochromen Zubereitung herbeiführbar ist.

26. Verfahren nach Anspruch 25, wobei die zum Farbwechsel benötigte Mindestlichtenergie über den pH-Wert der photochromen Zubereitung eingestellt wird.

5

27. Verfahren nach Anspruch 25 oder 26, wobei auf dem zu markierenden Gegenstand zwei insbesondere aneinandergrenzende Flächen A und B appliziert werden, wobei die erste Fläche A mit der Bakteriorhodopsin enthaltenden photochromen Zubereitung markiert wird, und das zweite Feld B mit einem nichtphotochromen Farbstoff versehen wird, dessen spektrale Remission sich im unbelichteten Zustand nicht von der des ersten Feldes unterscheidet, aber nach der Belichtung eine gegenüber dem ersten Feld unterschiedliche Remission zeigt.

15

28. Verfahren nach einem der Ansprüche 25 bis 27, wobei auf dem zu markierenden Gegenstand zwei insbesondere aneinandergrenzende Flächen A und B appliziert werden, wobei das erste Feld mit einer ersten Bakteriorhodopsin enthaltenden photochromen Zubereitung markiert wird, und das zweite Feld mit einer zweiten photochromen Zubereitung versehen wird, deren Lichtempfindlichkeit sich von der der ersten unterscheidet, so daß sich das zweite Feld im unbelichteten Zustand in seiner spektralen Remission nicht von dem ersten Feld unterscheidet, aber nach der Belichtung eine gegenüber dem ersten Feld unterschiedliche Remission zeigt.

20

25

29. Gegenstand mit einer Markierung, welche Bakteriorhodopsin enthält.

30

30. Gegenstand nach Anspruch 29 mit einer Markierung hergestellt nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15 oder 25 bis 28.

31. Gegenstand nach Anspruch 30, wobei die Markierung eine Tinte nach einem der Ansprüche 20 bis 24 enthält.

Zusammenfassung

Verfahren und Zubereitung zur photochromen Markierung und/oder zur
5 Sicherung der Authentizität von Gegenständen, wobei Bakteriorhodopsin-
Materialien und Zubereitungen daraus zur Applikation auf den Gegenständen
verwendet werden, in denen Niedrig- und Hochsicherheitsmerkmale
bevorzugt in Kombination verwendet werden.

31. März 1999

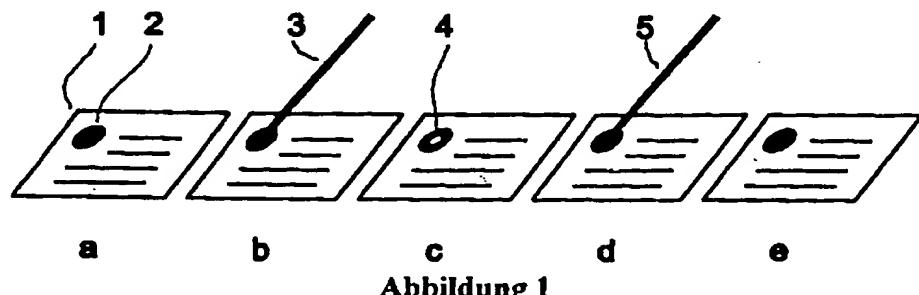


Abbildung 1

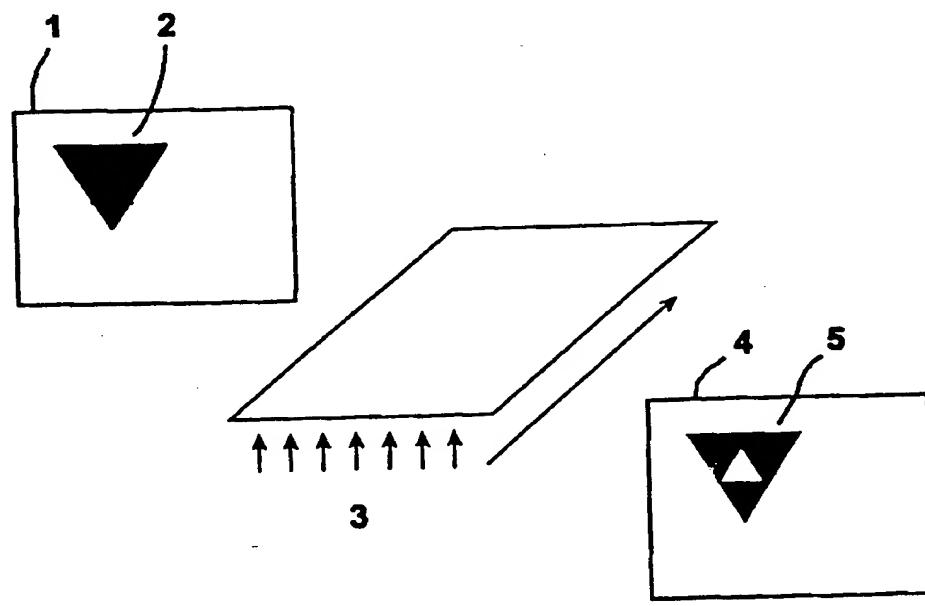


Abbildung 2

